

POWERED BY **Dialog**

Determination of an ester decomposition enzyme or a protease - using an azole cpd. substd. by amino acid or peptide
Patent Assignee: WAKO PURE CHEM IND LTD

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
JP 7242639	A	19950919	JP 94315829	A	19941125	199546	B

Priority Applications (Number Kind Date): JP 9414881 A (19940113)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
JP 7242639	A		11	C07D-233/70	

Abstract:
JP 7242639 A

Determination of an ester decomposition enzyme or a protease comprises using an azole cpd. of formula (I) as substrate. A = amino acid residue in which the amino gp. is protected or a peptide residue in which the N-terminal amino gp. is protected; R = opt. substd. aryl; X = O, S or opt. substd. NH.

ADVANTAGE - The method can detect leukocytes with no interference of coexisting substances.

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index
© 2002 Derwent Information Ltd. All rights reserved.
Dialog® File Number 351 Accession Number 10453923

DETERMINATION OF ESTERASE OR PROTEASE AND REAGENT COMPOSITION TO BE USED THEREFOR**Publication Number:** 07-242639 (JP 7242639 A), September 19, 1995**Inventors:**

- TANIGUCHI MASAOKI
- IWATA TSUTOMU
- TANAKA TAKUMI

Applicants

- WAKO PURE CHEM IND LTD (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application Number: 06-315829 (JP 94315829), November 25, 1994**International Class (IPC Edition 6):**

- C07D-233/70
- C07D-263/40
- C07D-277/34
- C12Q-001/37
- C12Q-001/44
- C07K-005/04
- C07K-007/06

JAPIO Class:

- 14.1 (ORGANIC CHEMISTRY--- Organic Compounds)
- 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY--- Microorganism Industry)
- 46.2 (INSTRUMENTATION--- Testing)

Abstract:

PURPOSE: To detect an esterase or protease, especially esterase existing in leukocyte by the development of a color (purple to blue) insusceptible to the coexisting substances by using a specific compound as a substrate.

CONSTITUTION: Esterase or protease is determined by using a compound of formula I (A is amino-protected amino acid residue or peptide residue having protected N-terminal amino group; R is a (substituted)aryl; X is O, S or a (substituted)imino), preferably a compound of

formula II (R' is an aryl, an alkoxy-substituted aryl or a halogen-substituted aryl; X' is S or imino) as a substrate.

JAPIO

© 2002 Japan Patent Information Organization. All rights reserved.

Dialog® File Number 347 Accession Number 4950039

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-242639

(43) 公開日 平成7年(1995)9月19日

(51) IntCl ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 233/70				
263/40				
277/34				
C 1 2 Q 1/37		6807-4B		
1/44		6807-4B		
審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 11 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-315829

(22) 出願日 平成6年(1994)11月25日

(31) 優先権主張番号 特願平6-14881

(32) 優先日 平6(1994)1月13日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000252300

和光純薬工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 谷口 雅亮

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工

業株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 岩田 勉

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工

業株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 田中 巧

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工

業株式会社大阪研究所内

(54) 【発明の名称】 エステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法及びこれに用いる試薬組成物

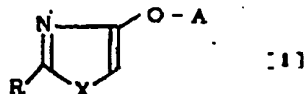
(57) 【要約】

血球検出用試験片。

【目的】 共存物質の影響を受けにくい呈色色調で迅速且つ高感度に検出することができる、新規アミノ酸エステル及びペプチドエステルを用いたエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法、及びこれに用いる試薬組成物の提供。

【構成】 一般式 [I]

【化1】



【式中、Aはアミノ基が保護されたアミノ酸残基又はN末端アミノ酸が保護されたペプチド残基を表わし、Rは置換基を有していてもよいアリール基を表わし、Xは酸素原子、硫黄原子又は置換基を有していてもよいイミノ基を表わす。】で示される化合物を基質として用いるエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法、及び該化合物を含んで成るエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定用試験片。該試験片は、該化合物を含んで成る、白

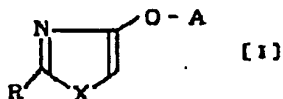
(2)

特開平7-242639

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式〔I〕

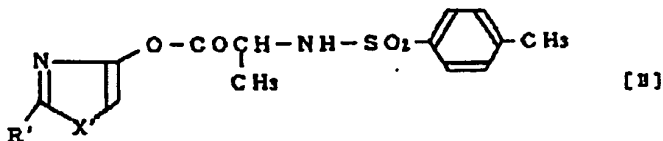
【化1】



〔式中、Aはアミノ基が保護されたアミノ酸残基又はN末端アミノ基が保護されたペプチド残基を表わし、Rは置換基を有していてもよいアリール基を表わし、Xは酸素原子、硫黄原子又は置換基を有していてもよいイミノ基を表わす。〕で示される化合物を基質として用いることを特徴とする、エステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法。

【請求項2】一般式〔I〕

【化2】



〔式中、R'はアリール基、アルコキシ置換アリール基又はハロゲン置換アリール基を表わし、X'は硫黄原子又はイミノ基を表わす。〕で示される化合物。

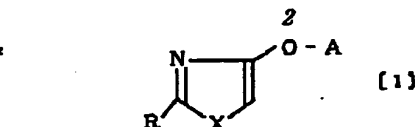
【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、例えば白血球エステラーゼ等のエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法及びこれに用いる試薬組成物に関する。

【0002】

【発明の背景】尿中白血球の検出は尿路感染症や腎疾患の診断の指標となり、従来尿沈渣鏡検法が広く用いられてきたが、この方法は手間及び時間がかかり熟練者を必要とするという問題点があった。これに対し近年、白血球中のエステラーゼ活性を利用した簡便な白血球検出用試験片が見い出されており、一部実用に供されている。この方法には、基質として用いたエステル化合物を白血球エステラーゼにより加水分解させてアルコール（フェノール）成分を生じさせ、これを直接呈色させる方法や、ジアゾニウム塩を共存させ、酵素反応によって生じたアルコール（フェノール）成分がジアゾニウム塩とカップリングして呈色する反応を利用する方法等があり、基質として用いるエステル化合物としては、前者の方法の場合にはスルホンフタレインエステル類（特開昭55-2992号公報）、アゾ染料エステル類（特公昭61-42749号公報）等があり、後者の方法の場合にはフェノキシアミノ酸エステル類（特公昭61-45982号公報）、インドキシルエステル類（特公平2-43480号公報）、フェニルピロキシルエステル類（特公昭62-41710号公報）等が知られている。



〔式中、Aはアミノ基が保護されたアミノ酸残基又はN末端アミノ基が保護されたペプチド残基を表わし、Rは置換基を有していてもよいアリール基を表わし、Xは酸素原子、硫黄原子又は置換基を有していてもよいイミノ基を表わす。〕で示される化合物とジアゾニウム塩と緩衝物質とを含んで成ることを特徴とする、エステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定用試薬組成物。

【請求項3】請求項2に記載の試薬組成物を吸収性担体又はフィルムに保持させて成る、白血球検出用試験片。

【請求項4】一般式〔II〕

【化3】

30

【0003】しかしながら、これらの基質を用いた方法は何れも反応に長時間を要し、検出感度が低いという欠点があった。この欠点を克服するためにエステラーゼの反応促進剤を添加することにより反応速度を向上させる試みもなされているが、未だに充分な感度を得られるには至っていない。また、現在実用化されている基質であるインドキシルエステルやフェニルピロキシルエステルを用いた方法では、呈色色素が赤紫色で浅いため、ヘモグロビン、ビリルビン等の着色性の共存物質の影響を受け易く、しかもこれらの基質は、製造に際しては、中間体が不安定であるため操作が煩雑で収率も低く、製造コストが高くなるという問題点もあった。

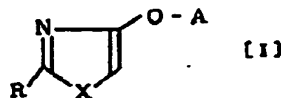
【0004】

【発明の目的】本発明は、上記した如き状況に鑑みられたもので、共存物質の影響を受けにくい紫～青色の深い呈色色素で白血球を迅速かつ高感度に検出することができ、しかも容易に且つ安価に製造することができる、エステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定用試薬組成物を提供することを目的とするものである。

【0005】

【発明の構成】本発明は、一般式〔I〕

【化4】



〔式中、Aはアミノ基が保護されたアミノ酸残基又はN末端アミノ基が保護されたペプチド残基を表わし、Rは置換基を有していてもよいアリール基を表わし、Xは硫

50

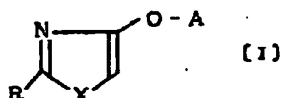
(3)

特開平7-242639

3

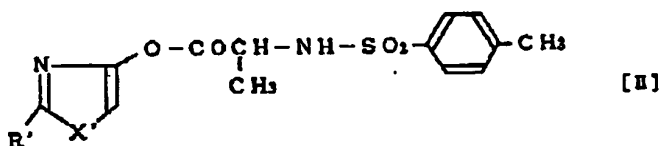
素原子、硫黄原子又は置換基を有していてもよいイミノ基を表わす。]で示される化合物を基質として用いることを特徴とする、エステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法の発明である。また、本発明は一般式 [I]

【化5】



[I]

*



[II]

【式中、R' はアリール基、アルコキシ置換アリール基又はハロゲン置換アリール基を表わし、X' は硫黄原子又はイミノ基を表わす。】で示される化合物の発明である。

【0006】即ち、本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、一般式 [I] で示される化合物を用いることによりエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素、特に白血球に存在するエステラーゼを、共存物質の影響を受けにくい深い呈色色調（紫～青色）で高感度に検出できることを見出し、本発明に到達した。これらの化合物は中間体が安定なので製造が容易で収率の高いものが多く、製造コストも必然的に安価である。

【0007】本発明に係る一般式 [I] で示される化合物に於て、A で示されるアミノ基が保護されたアミノ酸残基又はN末端アミノ基が保護されたペプチド残基のアミノ保護基としては、N-ベンジルオキシカルボニル基、N-(1-ブトキシカルボニル)基等の置換基を有していてもよいアルキルオキシカルボニル基、ベンゼンスルホニル基、トシル基等の置換基を有していてもよいアリールスルホニル基、置換基を有していてもよいスルフェニル基、置換基を有していてもよいホスホリル基、置換基を有していてもよいカルバモイル基等の、当該技術において周知のアミノ保護基を挙げることができる。また、アミノ酸残基としては、そのL-型、D-型、ラセミ型の何れも用いることができるが、L-型が特に好ましく、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン等のアミノ酸残基が好ましい。ペプチド残基としては、前記のアミノ酸を2～5個結合させたものが好ましい。

【0008】一般式 [I] に於て、R で示される置換基を有していてもよいアリール基の置換基としては、弗素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等のハロゲン原子、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等のアルコキシ基（直鎖状、分枝状何れにてもよい）、例えばメチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基等のアルキルアミノ基

* 【式中、A、R及びXは前記と同じ。】で示される化合物とジアゾニウム塩と緩衝物質とを含んで成ることを特徴とする、エステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定用試薬組成物の発明である。更に、本発明は該試薬組成物を吸収性担体又はフィルムに保持させて成る、白血球検出用試験片の発明である。更にまた、本発明は一般式 [II]

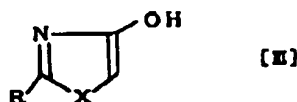
【化6】

（直鎖状、分枝状何れにてもよい）、例えばジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基等のジアルキルアミノ基（直鎖状、分枝状何れにてもよい）、例えばホルムアミド基、アセトアミド基、プロピオンアミド基、ブチルアミノ基等のアシルアミノ基（直鎖状、分枝状何れにてもよい）、シアノ基、ニトロ基等を挙げることができ、アリール基としては、例えばフェニル基、トリル基、ナフチル基、メチルナフチル基等が挙げられる。また、X で示される置換基を有していてもよいイミノ基の置換基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基等のアルキル基（直鎖状、分枝状何れにてもよい）、例えばフェニル基、トリル基、ナフチル基等のアリール基、ピロール基、ピリジル基等の複素環基等が挙げられる。

【0009】本発明に係る一般式 [II] で示される化合物に於て、R' で示されるアリール基、アルコキシ置換アリール基、ハロゲン置換アリール基のアリール基としては、例えばフェニル基、トリル基、ナフチル基、メチルナフチル基等が挙げられ、アルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基等（直鎖状、分子状何れにてもよい）が挙げられ、ハロゲン原子としては弗素、塩素、臭素、ヨウ素等が挙げられる。

【0010】一般式 [I] で示される化合物は大略以下の如くして製造することができる。即ち、先ず一般式 [III]

【化7】



[III]

【式中、R及びXは前記と同じ。】で表わされる3-ヒドロキシチアゾール誘導体、3-ヒドロキシオキサゾール誘導体又は3-ヒドロキシイミダゾール誘導体を、例えば、Acta Chemica Scandinavica, 第17巻, 144頁, 1963年, Journal of American Chemical Society, 第97, 72

5

97頁, 1975年, Acta Chemica Scandinavica, 第7巻, 1030頁, 1953年, 並びに成書J.V.Meizger著, "The Chemistry of Heterocyclic Compounds" 第34巻, Thiazole and Its Derivative, Part 2, 1979年, John Wiley & Sons出版, I.I. Turchi著, 同書第45巻, Oxazoles, 1986年, 及びK. Hofmann著, 同書, Imidazole and Derivatives, 1953年 等に記載の自体公知の方法に準じて合成する。次いで、この一般式 [II] で示される化合物と、アミノ基が保護されたペプチド又はアミノ基が保護されたアミノ酸或は適当なそれらの反応性誘導体 (例えば酸クロライド、クロルギ酸エチルエステル、活性エステル等) とを例えば泉屋ら著 "ペプチド合成" 丸善出版, 1975年, Houben-Weyl "Methoden der Organischen Chemie" 第25/1, 2巻, 1974年 等に記載のペプチド化学に慣用の方法で反応させれば、目的とする一般式 [I] で示される化合物を容易に且つ収率よく製造することができる。

【0011】本発明で用いられるジアゾニウム塩としては、例えば尿中白血球の検出に於ては他の尿中成分の影響を受けにくいものが好ましく、例えば2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム-テトラクロロジネート、1-ジアゾ-2-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム、4-ジメチルアミノベンゼンジアゾニウム-テトラフルオロボレート、2,4-ジメトキシベンゼンジアゾニウム-テトラフルオロボレート、4-メトキシベンゼンジアゾニウム-テトラフルオロボレート等を挙げることができる。

【0012】本発明に係る測定用試薬組成物は、生体試料、特に尿中のエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素、特に白血球中に存在するエステラーゼの測定に最適であり、これを用いることにより共存物質の影響を受けにくい紫〜青色の深い呈色色調で尿中の白血球を迅速且つ高感度に検出することができる。本発明に係る測定用試薬組成物は、液状試薬としても勿論使用可能であるが、特に試験片として使用する場合が最も有利である。本発明に係る一般式 [I] で示される化合物の測定用試薬組成物中の濃度は、目的とする酵素活性を検出し得る量であれば特に限定することなく挙げられるが、例えば試験片の形で用いる場合、吸収性担体に保持させるために用いられる含浸液中の濃度としては、通常0.1~100mM、好ましくは1~10mMが挙げられる。また、ジアゾニウム塩の使用濃度も特に限定されないが、例えば試験片の形で用いる場合、吸収性担体に保持させるために用いられる含浸液中の濃度としては、通常0.1~100mM、好ましくは1~10mMが挙げられる。

【0013】本発明で用いられる緩衝剤の種類としては、pHを6~10、好ましくは7~9に保ち、検知可能な応答反応を阻しないものであれば何れのものでもよく、例えばホウ酸塩緩衝剤、リン酸塩緩衝剤、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝剤、バルビツール酸塩緩衝剤等を挙げることができるが、勿論これらに限

(4)

特開平7-242639

6

定されるものではない。また、これら緩衝剤の測定用試薬中の使用濃度としては、pHを6~10、好ましくは7~9に保持し得る量であれば特に限定されことなく挙げられるが、例えば本発明に係る測定用試薬を吸収性担体に保持させるために用いられる緩衝液中の濃度としては、通常0.1~1Mが好ましく挙げられる。

【0014】本発明に係るエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定用試薬中には一般式 [I] で示される化合物とジアゾニウム塩、緩衝剤の他に反応促進剤や安定化剤、湿潤剤等の添加剤が含まれていてもよい。その使用量、使用濃度等は、通常この分野で使用される使用量、濃度範囲等から適宜選択すれば足りる。反応促進剤としては、例えば1-ヘキサノール、1-オクタノール、1-デカノール、1-ウンデカノール、1-ドデカノール、6-クロロ-1-ヘキサノール、2-クロロシクロヘキサノール、6-ブromo-1-ヘキサノール、8-ブromo-1-オクタノール、11-ブromo-1-ウンデカノール、12-ブromo-1-ドデカノール、1,10-デカンジオール、2-ヘキシルオキシエタノール等のアルコール類が、安定化剤としては、例えばリン酸トリモルホリド等が、また湿潤剤としては、例えば、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ラウリルピリジニウムクロリド、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等を挙げることができるが、勿論これらに限定されるものではない。

【0015】本発明に係る白血球検出用試験片は、一般式 [I] で示される化合物とジアゾニウム塩及び緩衝剤、更に要すれば反応促進剤、安定化剤、湿潤剤等の試薬類を含んで成る試薬組成物を、常法により吸収性担体に含浸、乾燥させることにより保持させるか、或は該試薬組成物を常法に従いフィルム上に塗布又はコーティングして保持させることにより容易に調製し得る。本発明の調製方法を、吸収性担体を用いる場合を例にとり、より具体的に示すと以下の如くなる。即ち、一般式 [I] で示される化合物とジアゾニウム塩、pH6~10、好ましくは7~9に保持し得る緩衝剤、更に要すれば反応促進剤、安定化剤、湿潤剤等の必要な試薬類を、水或はメタノール、エタノール等のアルコール、アセトン、ジメチルホルムアミド (DMF) 等の極性溶媒、若しくはこれら極性溶媒と水との混合溶媒中に適宜組み合わせ溶解して、1種又は2種以上の含浸液を調製し、適当な吸収性担体を該含浸液中に1乃至数回浸漬、乾燥した後、必要に応じて適宜所定の大きさに切断すれば、本発明の試験片を得ることができる。このようにして得られた試験片はそのまま使用してもよいし、例えばポリ塩化ビニル、ポリスチレン等のフィルム片等の支持体の一端に接着して使用してもよい。

【0016】本発明の試験片を調製するために使用される吸収性担体やフィルムとしては、ドライケミストリーの分野で通常用いられているものであれば特に限定されることなく挙げられるが、吸収性担体としては例えば濾

(5)

特開平7-242639

7

紙、不織布、ガラス繊維等が好ましく挙げられ、フィルムとしては厚さ300 μ m前後のポリスチレンシート等が好ましく挙げられる。本発明の試験片をフィルムを用いて調製する際、必要な試薬を保持した薄膜を形成するためには、適当な膜形成剤を用いることが必要となる。これらの膜形成剤としては、通常ドライケミストリーの分野で用いられているものであれば特に限定されることなく挙げられるが、例えばポリビニルアルコール樹脂、ポリビニルピロリドン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ポリエチレンオキサイド樹脂、若しくはポリ酢酸ビニル樹脂等の水溶性合成樹脂、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース若しくはカルボキシメチルセルロース等の水溶性セルロース誘導体、デンプン、多糖類、ゼラチン、カゼイン、アラビアゴム、若しくはアルギン酸ナトリウム等の天然高分子等が挙げられる。尚、本発明に係る測定用試薬組成物は、これを試験片に保持させて使用する以外にも、例えばこれを直接検体中に添加溶解して測定に供するとか、該測定用試薬を含有する溶液中に検体を添加して測定を行う等も可能なので、このようにして測定を実施してもよい。以下に、参考例及び実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0017】

【実施例】

参考例1. カルボキシメチル チオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

チオベンズアミド5.7g (アルドリッチ社製) のベンゼン溶液30mlにプロモ酢酸5.8gのベンゼン溶液40mlを加え、室温で15時間反応させた。析出した結晶を濾取し、エーテルで洗浄後乾燥してカルボキシメチル チオベンズイミデート臭化水素酸塩9.0gを得た (収率78.8%)。

参考例2. 2-フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例1で得たカルボキシメチル チオベンズイミデート臭化水素酸塩8.3gにピリジン35mlを加え、室温で15時間反応させた。反応終了後、冷水250mlを加え、析出した結晶を濾取し、冷水で洗浄した。エタノールより再結晶を行い、2-フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶3.5gを得た (収率66.0%)。

参考例3. N-トシル-L-アラニルクロリドの合成

N-トシル-L-アラニン12gと塩化チオニル25mlとの混合物を50℃で90分間反応させた。反応終了後、氷冷下にヘキサン200mlを加えて結晶化させてN-トシル-L-アラニルクロリド11.6gを得た (収率90.0%)。融点：90~100℃。

【0018】実施例1. 2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例2で得た2-フェニル-4(5H)チアゾロン3.0gと、N,N-ジメチルアミノピリジン2.5gのDMF溶液30mlに、氷冷下参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロ

8

リド5.32gを加え、2時間反応させた。反応終了後、溶媒を留去し残渣を酢酸エチルで抽出し、抽出液を水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを留去し、得られた残渣をシリカゲルカラム [4.6 ϕ ×10cm, 充填剤：ワコーゲルC-300 (和光純薬工業(株)商品名), 溶離液：クロロホルム] で精製して、2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶4.09gを得た (収率60.0%)。融点：118~120℃。

IR (KBr) cm^{-1} : 3280(NH), 3110(CH), 1760(C=O), 1600(7 π 2 π)。

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm : 1.56(d, 3H, CH-CH₃, J=7.02Hz), 2.34(s, 3H, Ar-CH₃), 4.30(q, 1H, CH-CH₃, J=7.02, 8.64Hz), 5.49(d, 1H, NH, J=8.64Hz), 6.90(s, 1H, 7 π 2 π -HC=CH), 7.2~7.9(9H, ArH)。

元素分析値 C₁₈H₁₈N₂O₄S₂として

計算値 (%) : C 56.69, H 4.51, N 6.96

実測値 (%) : C 56.66, H 4.43, N 6.95。

【0019】参考例4. 4-メトキシチオベンズアミドの合成

4-メトキシベンゾニトリル13.3g、ピリジン30ml及びトリエチルアミン14mlから成る溶液に硫化水素ガスを3.5時間導入し、反応させた。反応終了後、反応液を水500ml中に注入し、析出した結晶を濾取した。トルエンより再結晶して、4-メトキシチオベンズアミドの黄色針状晶8.7gを得た (収率52.1%)。融点：146~147℃。

参考例5. カルボキシメチル 4-メトキシチオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例4で得た4-メトキシチオベンズアミド3.5gとプロモ酢酸3.48gを、参考例1と同様の方法で反応、後処理し、カルボキシメチル 4-メトキシチオベンズイミデート臭化水素酸塩5.22gを得た (収率81.6%)。

参考例6. 2-(4'-メトキシ)フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例5で得たカルボキシメチル 4-メトキシチオベンズイミデート臭化水素酸塩5.2gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(4'-メトキシ)フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶3.0gを得た (収率85.2%)。

【0020】実施例2. 2-(4'-メトキシ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例6で得た2-(4'-メトキシ)フェニル-4(5H)チアゾロン3.0gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド4.55gを実施例1と同様の方法で処理した後、酢酸エチル-エーテル-n-ヘキサンより結晶化して、2-(4'-メトキシ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの淡黄色結晶3.42gを得た (収率54.9%)。融点：110~111℃。

IR (KBr) cm^{-1} : 3300(NH), 3140(CH), 1775(C=O), 1610(7 π 2 π)。

(6)

特開平7-242639

9

10

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.57(d, 3H, CH-CH_3 , $J=7.56\text{Hz}$), 2.36(s, 3H, Ar-CH_3), 3.86(s, 3H, Ar-OCH_3), 4.27(q, 1H, CH-CH_3 , $J=7.56, 9.18\text{Hz}$), 5.28(d, 1H, NH, $J=9.18\text{Hz}$), 6.81(s, 1H, H^7 -Ar), 6.8~7.8(8H, ArH).

元素分析値 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$ として

計算値(%): C 55.54, H 4.66, N 6.48

実測値(%): C 55.48, H 4.61, N 6.37.

【0021】参考例7. 4-フルオロチオベンズアミドの合成

4-フルオロベンゾニトリル12.1g、ピリジン30ml及びトリエチルアミン14mlから成る溶液を参考例4と同様の方法で処理し、4-フルオロチオベンズアミドの黄色鱗片状結晶13.9gを得た(収率89.7%)。融点: 144~145°C.

参考例8. カルボキシメチル 4-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例7で得た4-フルオロチオベンズアミド3.88gとプロモ酢酸4.17gを、参考例1と同様の方法で反応、後処理し、カルボキシメチル 4-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩5.45gを得た(収率74.2%)。

参考例9. 2-(4'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例8で得たカルボキシメチル 4-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩5.4gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(4'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶1.91gを得た(収率53.5%)。

【0022】実施例3. 2-(4'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例9で得た2-(4'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロン1.9gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド3.06gを、実施例1と同様の方法で処理した後、エーテルより結晶化して、2-(4'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶2.21gを得た(収率54.0%)。

融点: 121~122°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3310(NH), 3140(CH), 1780(アミド), 1600(フェニル).

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.57(d, 3H, CH-CH_3 , $J=7.29\text{Hz}$), 2.36(s, 3H, Ar-CH_3), 4.29(q, 1H, CH-CH_3 , $J=7.29, 9.18\text{Hz}$), 5.38(d, 1H, NH, $J=9.18\text{Hz}$), 6.89(s, 1H, H^7 -Ar), 7.1~7.9(8H, ArH).

元素分析値 $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_4\text{S}_2$ として

計算値(%): C 54.24, H 4.08, N 6.66

実測値(%): C 54.05, H 4.15, N 6.65.

【0023】参考例10. 3-フルオロチオベンズアミドの合成

3-フルオロベンゾニトリル12.1g、ピリジン30ml及びトリエチルアミン14mlから成る溶液を参考例4と同様の方法で処理し、3-フルオロチオベンズアミドの黄色鱗片状結晶19.2gを得た(収率89.7%)。融点: 104~105°C.

10

20

30

40

50

参考例11. カルボキシメチル 3-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例10で得た3-フルオロチオベンズアミド3.88gとプロモ酢酸4.17gを、参考例1と同様の方法で反応、後処理し、カルボキシメチル 3-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩6.34gを得た(収率86.2%)。

参考例12. 2-(3'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例11で得たカルボキシメチル 3-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩6.3gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(3'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶2.21gを得た(収率52.9%)。

【0024】実施例4. 2-(3'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例12で得た2-(3'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロン2.2gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド3.53gを、実施例1と同様の方法で処理した後、エーテルより結晶化して、2-(3'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶1.70gを得た(収率33.9%)。

融点: 100~101°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3320(NH), 3130(CH), 1780(アミド), 1610(フェニル).

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.58(d, 3H, CH-CH_3 , $J=7.29\text{Hz}$), 2.37(s, 3H, Ar-CH_3), 4.30(q, 1H, CH-CH_3 , $J=7.29, 9.18\text{Hz}$), 5.29(d, 1H, NH, $J=9.18\text{Hz}$), 6.94(s, 1H, H^7 -Ar), 6.9~7.8(8H, ArH).

元素分析値 $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_4\text{S}_2$ として

計算値(%): C 54.27, H 4.08, N 6.66

実測値(%): C 54.05, H 4.19, N 6.65.

【0025】参考例13. 2-フルオロチオベンズアミドの合成

2-フルオロベンゾニトリル12.1g、ピリジン30ml及びトリエチルアミン14mlから成る溶液を参考例4と同様の方法で処理し、2-フルオロチオベンズアミドの黄色針状結晶10.2gを得た(収率65.8%)。融点: 80.5~81°C.

参考例14. カルボキシメチル 2-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例13で得た2-フルオロチオベンズアミド3.88gとプロモ酢酸4.17gを、参考例1と同様の方法で反応、後処理し、カルボキシメチル 2-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩7.00gを得た(収率95.0%)。

参考例15. 2-(2'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例14で得たカルボキシメチル 2-フルオロチオベンズイミデート臭化水素酸塩7.0gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(2'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶4.03gを得た(収率83.3%)。

(7)

特開平7-242639

11

12

【0026】実施例5. 2-(2'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例15で得た2-(2'-フルオロ)フェニル-4(5H)チアゾロン2.34gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド3.77gを、実施例1と同様の方法で処理した後、エーテルより結晶化して、2-(2'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶2.77gを得た(収率55.0%)。

融点: 109~110°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3290(NH), 3110(CH), 1765(アミド), 1600(フェニル).

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.58(d, 3H, CH-CH₃, J=6.75Hz), 2.36(s, 3H, Ar-CH₃), 4.30(q, 1H, CH-CH₃, J=6.75, 9.18Hz), 5.33(d, 1H, NH, J=9.18Hz), 7.00(s, 1H, f7' γ -H-C-5H), 7.15~8.2(8H, ArH).

元素分析値 C₁₇H₁₇FN₃O₄S₂として

計算値(%): C 54.27, H 4.08, N 6.66

実測値(%): C 54.01, H 4.23, N 6.65.

【0027】参考例16. 3,5-ジメトキシチオベンズアミドの合成

3,5-ジメトキシベンゾニトリル16.3g、ピリジン40ml及びトリエチルアミン14mlから成る溶液を参考例4と同様の方法で処理し、得られた粗結晶をエタノールより再結晶を行って3,5-ジメトキシチオベンズアミドの黄色針状結晶14.4gを得た(収率73.1%)。融点: 117~118°C.

参考例17. カルボキシメチル 3,5-ジメトキシチオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例16で得た3,5-ジメトキシチオベンズアミド4.93gとプロモ酢酸4.17gを、参考例1と同様の方法で反応、後処理し、カルボキシメチル 3,5-ジメトキシチオベンズイミデート臭化水素酸塩7.30gを得た(収率86.8%)。

参考例18. 2-(3',5'-ジメトキシ)フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例17で得たカルボキシメチル 3,5-ジメトキシチオベンズイミデート臭化水素酸塩7.3gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(3',5'-ジメトキシ)フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶4.56gを得た(収率88.5%)。

【0028】実施例6. 2-(3',5'-ジメトキシ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例18で得た2-(3',5'-ジメトキシ)フェニル-4(5H)チアゾロン2.85gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド3.77gを、実施例1と同様の方法で処理した後、エーテルより結晶化して、2-(3',5'-ジメトキシ)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶2.12gを得た(収率38.2%)。

融点: 110~112°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3280(NH), 3110(CH), 1760(アミド), 1600(フェニル).

10

20

30

40

50

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.58(d, 3H, CH-CH₃, J=7.02Hz), 2.36(s, 3H, Ar-CH₃), 3.85(s, 6H, 2×OCH₃), 4.29(q, 1H, CH-CH₃, J=7.02, 8.91Hz), 5.28(d, 1H, NH, J=8.91Hz), 6.90(s, 1H, f7' γ -H-C-5H), 7.0~7.8(7H, ArH).

元素分析値 C₂₁H₁₈N₃O₆S₂として

計算値(%): C 54.53, H 4.79, N 6.06

実測値(%): C 54.22, H 4.99, N 5.98.

【0029】参考例19. 4-メチルチオベンズアミドの合成

4-メチルベンゾニトリル11.7g、ピリジン30ml及びトリエチルアミン14mlから成る溶液を、参考例4と同様の方法で処理し、4-メチルチオベンズアミドの黄色針状結晶9.2gを得た(収率60.9%)。融点: 165~166°C.

参考例20. カルボキシメチル 4-メチルチオベンズイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例19で得た4-メチルチオベンズアミド3.78gとプロモ酢酸4.17gを、参考例1と同様の方法で反応、後処理し、カルボキシメチル 4-メチルチオベンズイミデート臭化水素酸塩5.52gを得た(収率76.1%)。

参考例21. 2-(4'-メチル)フェニル-4(5H)チアゾロンの合成

参考例20で得たカルボキシメチル 4-メチルチオベンズイミデート臭化水素酸塩5.5gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(4'-メチル)フェニル-4(5H)チアゾロンの黄色結晶2.21gを得た(収率60.9%)。

【0030】実施例7. 2-(4'-メチル)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成

参考例21で得た2-(4'-メチル)フェニル-4(5H)チアゾロン2.2gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド3.61gを、実施例1と同様の方法で処理した後、エーテルより結晶化して、2-(4'-メチル)フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶4.35gを得た(収率90.8%)。

融点: 143~144°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3290(NH), 3110(CH), 1760(アミド), 1600(フェニル).

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.57(d, 3H, CH-CH₃, J=7.02Hz), 2.35(s, 3H, Ar-CH₃ (3H)), 2.40(s, 3H, Ar-CH₃), 4.28(q, 1H, CH-CH₃, J=7.02, 8.64Hz), 5.31(d, 1H, NH, J=8.64Hz), 6.85(s, 1H, f7' γ -H-C-5H), 7.2~7.8(8H, ArH).

元素分析値 C₂₀H₁₈N₃O₄S₂として

計算値(%): C 57.67, H 4.84, N 6.73

実測値(%): C 57.79, H 4.78, N 6.65.

【0031】参考例22. 2-チオナフトアミドの合成

2-ナフトニトリル9.75g、ピリジン20ml及びトリエチルアミン9.2mlから成る溶液を参考例4と同様の方法で処理し、2-チオナフトアミドの赤褐色針状結晶8.24gを得た(収率69.2%)。融点143~144°C.

(8)

特開平7-242639

13

参考例23. カルボキシメチル 2-チオナフトイミデート臭化水素酸塩の合成

参考例22で得た2-チオナフトアミド5.0g、ベンゼン80ml及びTHF40mlの混液にプロモ酢酸3.7gのベンゼン溶液30mlを加え、参考例1と同様に反応、後処理し、カルボキシメチル 2-チオナフトイミデート臭化水素酸塩7.26gを得た(収率83.2%)。

参考例24. 2-(2-ナフチル)-4(5H)チアゾロンの合成

参考例23で得たカルボキシメチル 2-チオナフトイミデート臭化水素酸塩7.26gにピリジン35mlを加え、参考例2と同様の方法で処理し、2-(2-ナフチル)-4(5H)チアゾロンの黄色結晶3.78gを得た(収率75.6%)。

【0032】実施例8. 2-(2-ナフチル)-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの合成参考例24で得た2-(2-ナフチル)-4(5H)チアゾロン3.5gと、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド4.9gを、実施例1と同様の方法で処理した後、クロロホルム-ヘキサンより再結晶して、2-(2-ナフチル)-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの白色結晶3.20gを得た(収率51.7%)。

融点: 137~138°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3275(NH), 3150(CH), 1780(=N), 1610(=N).

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.59(d, 3H, CH-CH₃, J=7.29Hz), 2.36(s, 3H, Ar-CH₃), 4.25~4.40(m, 1H, CH-CH₃), 5.27(d, 1H, NH, J=8.64Hz), 6.94(s, 1H, 4'-H-C-5H), 7.2~8.4(11H, ArH).

元素分析値 C₂₁H₁₉N₃O₄S₂として

計算値(%): C 61.04, H 4.45, N 6.19

実測値(%): C 60.95, H 4.38, N 6.18.

【0033】参考例25. 2-フェニル-3,5-ジヒドロイミダゾール-4-オンの合成

ベンズアミジン塩酸塩3g、グリシンエチルエステル塩酸塩8.4g、炭酸水素ナトリウム8g及びメタノール70mlから成る混合液を、窒素気流中2.5時間還流反応させた。冷却後、クロロホルムと水を加えて抽出しクロロホルム層*

(含浸液1)

ホウ酸

4.94g

水酸化ナトリウム

0.40g

蒸留水

全量100ml (pH7.0)

(含浸液2)

2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾール 121mg

2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム-テトラクロロジネケート

97.2mg

反応促進剤を含有するメタノール溶液

100ml

(反応促進剤として6-プロモ-1-ヘキサノール3%(W/V)、11-プロモ-1-ウンデカノール1%(W/V)、又は12-プロモ-1-ドデカノール1%(W/V)を使用)

【操作法及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より分離した白血球成分を添加し、全血に標準濃度中に混合し、57

14

*を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。クロロホルムを減圧下に留去して、2-フェニル-3,5-ジヒドロイミダゾール-4-オンの赤色結晶700mgを得た。

【0034】実施例9. 2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)イミダゾールの合成

参考例25で得た2-フェニル-3,5-ジヒドロイミダゾール-4-オン500mg、トリフルオロ酢酸0.6ml及びピリジン0.3mlを溶解したテトラヒドロフラン10mlの溶液に窒素気流下、参考例3で得たN-トシル-L-アラニルクロリド1.0gのテトラヒドロフラン4ml溶液を-20~-10°Cに冷却下10分かけて添加した。同温度で1時間反応後、4Mクエン酸水溶液25mlを加え酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄後無水硫酸ナトリウムで乾燥し酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラム[充填剤: ワコーゲルPC-40 (和光純薬工業(株)商品名)、溶離液: 5%アセトン-クロロホルム]で精製して、2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)イミダゾールの微黄色結晶339mgを得た(収率31%)。

融点: 25~25°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3300(NH), 1760(=N), 1670(=N), 1600(=N).

$^1\text{H-NMR}$ (270MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.35(d, 3H, CH-CH₃, J=7.02Hz), 2.34(s, 3H, Ar-CH₃), 3.80~4.00(m, 1H, CH-CH₃), 5.55(d, 1H, NH, J=8.64Hz), 6.95(s, 1H, 4'-H-C-5H), 7.2~7.9(9H, ArH).

元素分析値 C₂₁H₁₉N₃O₄Sとして

計算値(%): C 59.38, H 4.72, N 10.93

実測値(%): C 59.24, H 4.85, N 10.90.

【0035】実施例10

【試験片の調製】濾紙を下記の含浸液1に浸漬し、乾燥した後、実施例1で得た2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールを含有する下記含浸液2に浸漬し、乾燥して試験片を作製した。

目視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青紫色に呈色した。また、検体浸漬2分後に10個/ μl という低濃度の白血球を検出することが可能であった。表1にプレテスターRM-405 (和光純薬工業(株)製)を用いた、測定波長565nm (参照波長760nm) に於ける反射率を

(9)

特開平7-242639

15

16

測定した結果を示す。

* * 【表1】

表 1

(%)

反応促進剤	白血球 (個/μl)			
	0	10	30	100
6-7' αモ-1-4キチノ-ル(8%)	69.8	68.6	60.8	61.0
11-7' αモ-1-477' αノ-ル(1%)	58.1	54.5	49.2	40.8
12-7' αモ-1-ド' αノ-ル(1%)	62.1	57.9	52.2	50.2

【0036】実施例11

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル
4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに
に実施例5で得た2-(2'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシ
ル-L-アラニルオキシ)チアゾール126mgを用いた以外は
実施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片
を作製した。

【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離し
た白血球画分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目
視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青色に呈
色した。

【0037】実施例12

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル
4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに
に実施例4で得た2-(3'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシ
ル-L-アラニルオキシ)チアゾール126mgを用いた以外は
実施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片
を作製した。

【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離し
た白血球画分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目
視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青色に呈
色した。

【0038】実施例13

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル
4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに
に実施例3で得た2-(4'-フルオロ)フェニル-4-(N-トシ
ル-L-アラニルオキシ)チアゾール126mgを用いた以外は
実施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片
を作製した。

【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離し
た白血球画分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目
視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青色に呈

色した。

20 【0039】実施例14

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル
4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに
に実施例7で得た2-(4'-メチル)フェニル-4-(N-トシ
ル-L-アラニルオキシ)チアゾール125mgを用いた以外は実
施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を
作製した。

【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離し
た白血球画分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目
視観察したところ、試験片はその濃度に応じて藤色に呈
色した。

30

【0040】実施例15

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル
4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに
に実施例2で得た2-(4'-メトキシ)フェニル-4-(N-トシ
ル-L-アラニルオキシ)チアゾール129mgを用いた以外は
実施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片
を作製した。

【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離し
た白血球画分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目
視観察したところ、試験片はその濃度に応じて藤色に呈
色した。

40

【0041】実施例16

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル
4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに
に実施例6で得た2-(3',5'-ジメトキシ)フェニル-4-(N
-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾール139mgを用いた
以外は実施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により
試験片を作製した。

【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離し
た白血球画分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目

50

(10)

特開平7-242639

17

視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青色に呈色した。

【0042】実施例17

【試験片の調製】実施例10の含浸液2中の2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに実施例8で得た2-(2-ナフトル)-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾール136mgを用いた以外は実施例10と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を作製した。

(含浸液1)

ホウ酸

2.47g

水酸化ナトリウム

0.36g

蒸留水

全量100ml (pH8.0)

(含浸液2)

2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾール

121mg

1-ジアゾ-2-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウム

81.7mg

1-デカノール

1.0g

メタノール

100ml

【測定及び結果】上記試験片を、ヒト全血より単離した白血球固分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青色に呈色した。

【0044】実施例19

【試験片の調製】実施例18の含浸液2中の1-ジアゾ-2-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウムの代わりに2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム-テトラクロロジネケート97.2mgを用いた以外は実施例18と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を作製した。

【測定及び結果】上記試験片を、白血球無添加でヘモグロビンを300mg/dl添加した尿および白血球30個/ μ lでヘモグロビンを300mg/dl添加した尿に夫々浸漬後直ちに引き上げ、2分後に目視観察したところ、前者では淡暗褐色、後者では淡暗紫色に呈色し、両者の区別が容易であった。

【0045】比較例1

【試験片の調製】実施例18の含浸液2中の2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに3-(N-トシル-L-アラニルオキシ)-5-フェニルピロール115mgを用いた以外は実施例18と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を作製した。

【測定及び結果】上記試験片を、白血球無添加でヘモグロビンを300mg/dl添加した尿および白血球30個/ μ lでヘモグロビンを300mg/dl添加した尿に夫々浸漬後直ちに引き上げ、2分後に目視観察したところ、前者、後者共に淡褐色に呈色し、両者の区別が困難であった。

【0046】比較例2。

【試験片の調製】実施例18の含浸液2中の2-フェニル

(含浸液1)

ホウ酸

4.94g

水酸化ナトリウム

0.80g

18

*【測定及び結果】上記各試験片を、ヒト全血より単離した白血球固分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目視観察したところ、試験片はその濃度に応じて青色に呈色した。

【0043】実施例18

【試験片の調製】濾紙を下記の含浸液1に浸漬し、乾燥した後、実施例1で得た2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールを含有する下記含浸液2に浸漬し、乾燥して試験片を作製した。

4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに3-(N-トシル-L-アラニルオキシ)インドール108mg、1-ジアゾ-2-ナフトール-4-スルホン酸ナトリウムの代わりに2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム-テトラクロロジネケート97.2mgを用いた以外は実施例18と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を作製した。

【測定及び結果】上記試験片を、白血球無添加でヘモグロビンを300mg/dl添加した尿および白血球30個/ μ lでヘモグロビンを300mg/dl添加した尿に夫々浸漬後直ちに引き上げ、2分後に目視観察したところ、前者、後者共に淡褐色に呈色し、両者の区別が困難であった。

【0047】実施例20

【試験片の調製】実施例18の含浸液2中の2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに実施例9で得た2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)イミダゾール116mgを用いた以外は実施例18と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を作製した。

【測定及び結果】上記試験片を、ヒト全血より単離した白血球固分を添加した尿に浸漬後直ちに引き上げ、目視観察したところ、試験片はその濃度に応じて紫色に呈色した。

【0048】実施例21

【試験片の調製】濾紙を下記の含浸液1に浸漬し、乾燥した後、実施例1で得た2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールを含有する下記含浸液2に浸漬し、乾燥して試験片を作製した。

(11)

特開平7-242639

19	20
塩化ナトリウム	1.46 g
ポリビニルピロリドン (和光純薬工業(株)製, K-30)	2.0 g
蒸留水	全量100ml (pH8.0)
(含浸液2)	
2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾール	80.5mg
2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム-テトラクロロジネート	64.8mg
1-デカノール	1.0 g
メタノール	100ml

【測定及び結果】上記試験片を、ヒト全血より単離した白血球画分を添加した生理食塩水に浸漬後直ちに引き上げ、2分後にプレテスターRM-405を用い、測定波長565nm (参照波長760nm) に於ける反射率を測定した。結果を表2に示す。

【0049】比較例3

【試験片の調製】実施例21の含浸液2中の2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールの代わりに3-(N-トシル-L-アラニルオキシ)インドール71.7mgを用いた以外は実施例21と同じ試薬を用い、同様の操作により試験片を作製した。

【測定及び結果】上記試験片を、ヒト全血より単離した白血球画分を添加した生理食塩水に浸漬後直ちに引き上げ、2分後にプレテスターRM-405を用い、測定波長565nm (参照波長760nm) に於ける反射率を測定した。結果を表2に併せて示す。

【表2】

表 2

(%)

試験片	白血球 (個/μl)			
	0	50	150	500
実施例21	95.0	53.5	32.3	17.8
比較例3	98.2	79.4	57.3	33.1

10 表2より、基質として本発明の2-フェニル-4-(N-トシル-L-アラニルオキシ)チアゾールを用いた方法は、従来の3-(N-トシル-L-アラニルオキシ)インドールを用いた方法に比べ、広範囲の白血球濃度に於て、高い感度で測定できることが判る。

【0050】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は容易に且つ安価に製造できる新規アミノ酸エステル及びペプチドエステルと、該化合物を用いたエステル分解酵素又は蛋白質分解酵素の測定方法並びに測定用試薬組成物を提供するものであり、本発明に係る測定用試薬を担体に保持させて成る試験片を用いることにより、共存物質の影響を受けにくい深い呈色色調（紫～青色）で白血球を迅速且つ高感度に検出することができる点に顕著な効果を奏する発明であり、新薬に貢献するところ極めて大なる発明である。

30

40

フロントページの続き

(51)Int. Cl. *

// C07K 5/04
7/06

識別記号

庁内整理番号
8318-4H

FI

技術表示箇所